

**ISOLASI BAKTERI TANAH ENTOMOPATOGENIK  
(*Bacillus spp.*) DI DAERAH ISTIMEWA YOGYAKARTA DAN  
UJI PATOGENITASNYA TERHADAP ULAT GRAYAK,  
*Spodoptera litura* (Fab)**

**Isolation of Entomopathogenic Bacteria (*Bacillus spp.*) from soil  
Surrounding Yogyakarta Special Territory and Their Pathogenicity Test  
Against Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Fab)**

**J. Situmorang \***

**Abstrak**

Telah dilakukan isolasi bakteri pembentuk spora entomopatogenik dari tanah di berbagai tempat di Daerah Istimewa Yogyakarta dan uji patogenisitasnya di laboratorium terhadap ulat grayak, *Spodoptera litura* (Fab) instar ketiga.

Sampel tanah diambil dari areal pertanian, perkebunan, daerah aliran sungai, rawa-rawa dan tempat lain yang diperkirakan mengandung bakteri pembentuk spora dan kemudian diisolasi di laboratorium sesuai metoda Aizawa *et. al.* (1961). Dari 87 sampel yang terkumpul diperoleh 34 isolat bakteri pembentuk spora yang diantaranya terdapat 2 isolat yang bersifat patogenik terhadap ulat grayak, yaitu isolat GK7 dan KP3 yang masing-masing menimbulkan mortalitas 70 % dengan dosis  $3,04 \times 10^8$  spora/ml dan 46,66% dengan dosis  $1,22 \times 10^8$  spora/ml. Berdasarkan simpton yang ditimbulkannya pada serangga uji, uji postulat Koch positif, pengecatan gram positif, pengecatan Smirnoff, ciri morfologis dan sifat fisiologisnya, maka isolat-isolat tersebut adalah *Bacillus thuringiensis* Berliner yang berdasarkan mortalitas yang ditimbulkannya dengan dosis uji, tergolong bakteri berdaya bunuh potensial.

Kata kunci : Bakteri tanah, *Bacillus thuringiensis*, uji patogenisitas, ulat grayak, Daerah Istimewa Yogyakarta.

---

\* Lab Entomologi, Fakultas Biologi UGM

## Abstract

Isolation of sporeformer entomopathogenic bacteria from soil samples collected from various localities surrounding Yogyakarta Special Territory and pathogenicity test of the bacteria against third instar larvae of cutworm, *Spodoptera litura* (Fab) had been carried out in the laboratory

Soil samples were collected from agricultural areas, plantations, river banks, swamps, and other areas that were suspected to contain sporeformer bacteria and then isolated in the laboratory according to the method of Aizawa *et. al.* (1961)

From the total number of 87 samples collected it revealed that 34 isolates belonged to the sporeformer bacteria, among which two isolates were found to be pathogenic against the cut worm, i.e. the isolate GK7 and KP3 that caused 70% mortality with a dosage of  $3.04 \times 10^8$  spores/ml and 46.66% mortality with a dosage of  $1.22 \times 10^8$  spores/ml respectively. Judging from the symptoms, the positive Koch postulate, gram positive staining, Smirnoff staining, morphology and physiological reactions, the two isolates were positively to be *Bacillus thuringiensis* Berliner. Based on the high mortality produced and the dosage used, the bacteria could be categorized as potential entomopathogenic bacteria.

Key words : Soil bacteria, *Bacillus thuringiensis*, pathogenicity test, cutworm, Yogyakarta Special Territory.

## Pendahuluan

Pengalaman para ahli hama tanaman dan vektor penyakit selama ini menunjukkan bahwa pemakaian insektisida kimia menimbulkan dampak negatif yang memprihatinkan. Di antara dampak negatif yang sering timbul ialah menjadi kebalnya hama tanaman dan vektor penyakit, terjadinya resurgensi hama, pencemaran lingkungan yang berbahaya bagi jiwa manusia dan biota lain, serta semakin besarnya biaya pengendalian karena dosis dan harga yang semakin meningkat. Kenyataan ini menyebabkan perhatian para ilmuwan dan praktisi pengendalian hama dan vektor penyakit beralih untuk mencari alternatif lain, yang dalam hal ini terutama menaruh perhatian kepada cara-cara pengendalian secara hayati. Di antara agensi hayati yang telah banyak diteliti dan dipakai adalah bakteri pembentuk spora (*sporeformer bacteria*) seperti *Bacillus thuringiensis*, *B. popilliae*, dan *B. sphaericus*. Bakteri pembunuh serangga hama dan vektor penyakit tersebut menghasilkan  $\delta$ -endotoksin yang berupa kristal protein dan sangat beracun. Dari berbagai hasil penelitian dan pengalaman para ahli selama ini pemakaian bakteri tersebut sangat menguntungkan antara lain karena tidak membunuh biota yang bukan sasaran, persisten, dan dapat berkembang di lapangan mencapai kondisi epizootik. Selain itu dapat pula

diupayakan peningkatan virulensinya melalui seleksi dan rekayasa genetik (Dulmage, 1981; Fast, 1981; Martin and Dean, 1981; Falcon, 1971). Karena sifat-sifatnya yang menguntungkan itu, maka dewasa ini telah banyak strain-strain *B. thuringiensis* yang diproduksi sebagai insektisida mikrobial seperti misalnya Sporeine, Parasporeine, Thuricida, Dipel, Bactopheine, Bacthane, Bactukal, Bathurine, Agritol, Biospore, Entobacterine 3, Dendrocilline, Bactimos, Biotrol, Teknar dan lain-lain yang telah diperdagangkan secara meluas di dunia (Tryon and Litsinger, 1988; Burges and Hussey, 1971).

Bakteri-bakteri pembentuk spora dapat diisolasi dari tanah, air, atau serangga terinfeksi karena sporanya yang dikenal sebagai endospora sangat tahan di alam. Endospora tersebut terakumulasi, dari hancuran bangkai serangga-serangga yang sebelumnya terinfeksi oleh strain-strain bakteri spesifik tertentu. Situmorang *et. al.* (1989) dalam upaya mencari bakteri patogenik terhadap nyamuk, *Culex quinquefasciatus*, menemukan strain baru *Bacillus sphaericus* dari Pituruh (Purworejo) dan Sewon (Bantul). Diperkirakan bahwa strain-strain *B. thuringiensis* dan bakteri entomopatogenik lainnya dapat diisolasi dari berbagai tempat di seluruh kepulauan Indonesia. Mengingat sifat-sifat yang baik dari bakteri pembentuk spora tersebut untuk dijadikan sebagai agensi pengendali hama dan vektor penyakit, perlu dilakukan pencarian bakteri-bakteri spesifik untuk lebih mengungkap kekayaan biotik di Indonesia dan kemudian dimanfaatkan sebaik-baiknya. Pencarian bakteri semacam ini dimulai dari daerah yang terbatas (Daerah Istimewa Yogyakarta) mengingat faktor biaya dan waktu yang terbatas. Bakteri tersebut kemudian perlu diuji patogenisitas terhadap berbagai jenis hama dan vektor penyakit karena strain-strain bakteri itu spesifik patogenik hanya terbatas pada jenis-jenis tertentu saja. Dalam kesempatan ini patogenisitasnya diuji terhadap ulat grayak, *Spodoptera litura* (Fab), yang merupakan salah satu hama penting di Indonesia. Ulat grayak tersebut menyerang berbagai tanaman seperti padi, kedelai, kubis, tomat, jagung dan tanaman-tanaman lain (Kalohoven, 1981). Pada tahun 1987 ulat grayak ini menyerang kedelai di 15 propinsi dengan luas areal sekitar 26.000 hektar dengan intensitas rata-rata 22 persen (BPS, 1988).

## Bahan dan Cara Kerja

### Isolasi Bakteri Pembentuk Spora

Sampel tanah dikoleksi dari areal pertanian, kebun, daerah aliran sungai, rawa, tempat-tempat tertentu yang dicurigai mengandung endospora bakteri, atau ulat grayak yang terinfeksi terutama di berbagai tempat yang telah diketahui merupakan daerah pertanian yang terserang ulat grayak. Isolasi bakteri di

laboratorium dilakukan sesuai dengan metoda Aizawa *et. al.* (1961) dengan media kultur nutrisi agar.

## Morfologi Koloni dan Sel Bakteri

### Karakteristik koloni

- Biakan murni bakteri berumur 1 hari sampai 3 atau 5 hari diamati dengan seksama mengenai bentuk koloni, elevasi, permukaan, pinggir, densitas dan warna (*chromogenesis*).
- Dari biakan berumur 3 - 5 hari dibuat sediaan preparat dengan menggunakan fiksasi albumin atau air steril di atas lampu spiritus yang nyala cukup kecil. Sediaan preparat tersebut selanjutnya diamati di bawah mikroskop fase kontras untuk mengidentifikasi sel vegetatif, spora, dan kristal proteinnya. Untuk lebih jelas mengenai struktur dalam sel dan karakteristik spora serta kristal proteinnya, sediaan dicat dengan pengecatan Smirnov (1962) dan dilihat dengan perbesaran kuat. Selain itu dilakukan pengecatan gram untuk mengetahui sifat gram bakteri.

### Sifat Fisiologis

Berdasarkan metoda isolasi tersebut di atas, maka kemungkinan bakteri yang diperoleh adalah bakteri yang tergolong *Bacillus*. Pengujian sifat fisiologis atau biokimia dimaksudkan untuk mengetahui sifat spesies. Pengujian fisiologis tersebut meliputi pengujian resistensi terhadap antibiotik, aktifitas katalase, pembentukan asam dari karbohidrat, reaksi penghitaman glukosa dan tirosin, hidrolisis pati, hidrolisis hipourat, reduksi nitrat menjadi nitrit dan dekomposisi kasein.

### Pemeliharaan Serangga Uji

Ulat grayak instar terakhir dikoleksi dari lapangan, kemudian dipelihara di laboratorium dengan menempatkannya pada toples besar yang telah diberi daun ubi jalar segar; di bagian bawah toples diberi pasir steril setebal 3 cm untuk tempat memupa bagi ulat grayak. Pupa yang berumur 3 hari dipindahkan dalam cawan petri terbuka dengan 20 ekor per cawan petri. Selanjutnya dimasukkan dalam sangkar pemeliharaan yang dilengkapi dengan lembaran kertas rami atau buram untuk nantinya digunakan oleh ngengat betina sebagai tempat melekatkan kelompok telurnya (*egg-mass*). Telur berumur 1 hari dipanen dengan menggantung kertas sekeliling kelompok telur dan selanjutnya diinkubasikan.

Larva yang keluar dari telur dipelihara dalam toples yang dilengkapi dengan pakan berupa daun ubi jalar segar yang diganti tiap hari. Untuk pakan imago diberi cairan madu 5% yang dioleskan pada bola-bola kapas. Untuk larva uji digunakan larva instar ke-3 yang seragam umurnya.

### Uji Patogenisitas

Uji patogenisitas bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menginfeksi dan menimbulkan kematian pada ulat grayak dengan jumlah spora tertentu dalam batas kisaran yang dipandang potensial sampai virulen yang tergantung dari besarnya persentase kematian serangga uji. Pada pengujian ini jumlah spora adalah pada konsentrasi pengenceran spora  $10^{-4}$  yang berdasarkan perhitungan memakai hemocytometer =  $A \times 10^8$  spora/ml ( $A \times 10$ ). Tiap isolat diuji patogenisitasnya terhadap ulat grayak dengan cara berikut :

- Biakan isolat berumur 7 - 10 hari disuspensikan dalam cairan garam fisiologis (PSS) steril, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang sehingga tinggal pellet.
- Sentrifugasi seperti di atas dilakukan tiga kali dan airnya dibuang.
- Ke dalam tabung berisi pellet ini ditambahkan PSS tetes demi tetes sehingga kepekatan pellet sedemikian, kalau tabung digoyang maka pellet berupa suspensi pekat tersebut mulai turut bergoyang. Dengan menambah volume sembilan kali volume suspensi pekat tadi berarti dilakukan pengenceran  $10^{-1}$  dan selanjutnya dilakukan pengenceran sampai  $10^{-4}$ .
- Daun ubi jalar yang telah dicuci bersih dan dikeringanginkan dicelup ke dalam suspensi dan kembali dikeringanginkan. Setelah itu ditaruh dalam cawan petri besar (diameter 15 cm). Ke dalam cawan petri ini dimasukkan 10 ekor larva uji dengan ulangan 3 kali. Untuk kontrol pakan ubi jalar tidak diberi apa-apa sesudah dicuci. Rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Pengujian berlangsung selama 48 jam. Perkembangan penyakit pada serangga uji dicatat sejak mulai pengujian sampai serangga uji mati. Jumlah individu yang mati dicatat untuk perhitungan mortalitasnya.

### Uji Postulat Koch

Uji Postulat Koch dilakukan terhadap isolat yang potensial membunuh serangga uji. Uji Postulat Koch adalah untuk memastikan patogen yang benar-benar menimbulkan penyakit.

## Hasil dan Pembahasan

### Pemeliharaan Ulat Grayak

Pemeliharaan serangga uji secara teknis dan biologis berhasil dengan baik sehingga penyediaan serangga uji yang seragam dapat diperoleh secukupnya. Permasalahan yang timbul adalah mengenai perkembangan larva yang bervariasi sejak instar pertama, sehingga untuk mendapatkan instar ke-3 berumur seragam harus dilakukan pemilihan terhadap larva yang serentak ekdisis pada tiap instar. Dengan demikian jumlah larva permulaan (instar pertama) harus tersedia dalam jumlah yang lebih banyak.

### Hasil Isolasi Bakteri dan Uji Patogenisitas

Keseluruhan sampel yang terkumpul berjumlah 87, yaitu 22 sampel dari Kabupaten Gunung Kidul, 18 sampel dari Bantul, 34 sampel dari Kulon Progo dan 13 sampel dari Sleman.

Dengan proses isolasi yang dikerjakan menurut Aizawa *et al.* (1961), yaitu dengan pemanasan selama 30 menit pada suhu 65°C menyebabkan mikro-organisme selain endospora akan mati. Dengan demikian bakteri yang tumbuh dalam media kultur adalah bakteri pembentuk spora, khususnya *Bacillus spp.* Dari 87 sampel yang diperoleh didapatkan 34 isolat bakteri pembentuk spora, yaitu dari Gunung Kidul 9 isolat, dari Bantul 5 isolat, dari Kulon Progo 14 isolat, dan dari Sleman 6 isolat bakteri pembentuk spora (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah Sampel dan Isolat Bakteri Pembentuk Spora dari Berbagai Kabupaten di Daerah Istimewa Yogyakarta.

Kabupaten	Jumlah Isolat	Jumlah Isolat Bakteri Pembentuk Spora
Gunung Kidul	22	9
Bantul	18	5
Kulon Progo	34	14
Sleman	13	6
Total	87	34

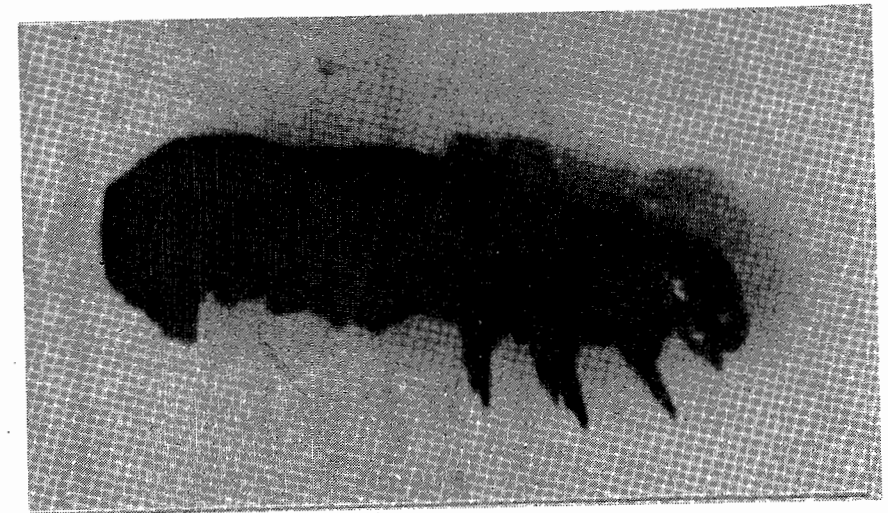
Dari hasil pengujian semua isolat bakteri tersebut terdapat 2 isolat yang dapat menimbulkan penyakit dan mematikan ulat grayak, yaitu isolat GK7 berasal dari Gunung Kidul dan isolat KP3 berasal dari Kulon Progo. Daya bunuh masing-masing isolat tersebut setelah 48 jam dengan dosis inokulum GK7 rata-rata  $3,04 \times 10^8$  spora/ml menyebabkan kematian 70 %, dan dengan dosis

KP3 rata-rata  $1,22 \times 10^8$  spora/ml menyebabkan kematian rata-rata 46,66 % (Tabel 2).

Tabel 2. Mortalitas Ulat Grayak yang Ditimbulkan Oleh Isolat GK7 dan KP3

Isolat	Konsentrasi *) (spora/ml)	Rata-rata Konsentrasi tiap isolat (spora/ml)	Mortalitas (%)	Rata-rata Mortalitas (%)
GK 7	$1,22 \times 10^8$ $4,80 \times 10^8$ $3,20 \times 10^8$	$3,04 \times 10^8$	56,67 86,67 66,67	70
KP 3	$5,9 \times 10^7$ $9,35 \times 10^7$ $2,14 \times 10^8$	$1,22 \times 10^8$	30,00 40,00 70,00	46,66

Gejala infeksi dimulai dengan perilaku larva yang selalu bergerak tetapi lamban, kemudian menjadi sangat lamban dan sama sekali tidak makan. Larva yang telah sangat lamban kadang-kadang mengeluarkan cairan dari mulut dan anus (diare). Larva yang menjadi diam ataupun yang baru mati mengalami gejala edema, kemudian berwarna gelap (Gambar 1). Bangkai tersebut berbau busuk, dan pada hari berikutnya semakin mengecil, khas sebagai bangkai larva yang terserang bakteri.



Gambar 1. Ulat grayak yang mati terinfeksi oleh *B.thuringiensis*

Bila diperhatikan perkembangan infeksi pada serangga uji, pada hari pertama telah mengakibatkan kematian serangga uji sebanyak rata-rata 20% pada kelompok yang diperlakukan dengan isolat GK7 dan 6,6 % oleh isolat KP3. Selanjutnya setelah 48 jam kematian serangga uji meningkat masing-masing perlakuan menjadi rata-rata 70 % dan 46,6 %.



Gambar 2. *Bacillus thuringiensis* Isolat GK7 dengan pengecatan Smirnov. Perbesaran 1000 x.

Pada uji Postulat Koch, kedua isolat tersebut positif. Dengan demikian bahwa patogen yang diisolasi kembali dari serangga terinfeksi dapat dimurnikan dengan ciri-ciri yang sama dengan yang menyebabkan infeksi sebelumnya dan kemudian dapat menginfeksi kembali dengan gejala yang sama. Ciri-ciri koloni menunjukkan bentuk yang hampir sama yaitu sirkuler, konvex, permukaan licin agak mengkilap, tepi halus, *opaque*. Perbedaan di antara keduanya hanya mengenai warna koloni, yaitu GK7 berwarna krem, sedangkan KP3 lebih pucat. Dengan pengecatan gram, kedua isolat tersebut bersifat gram positif. Struktur sel lebih jelas tampak pada sediaan yang diberi warna cat Smirnov, yaitu sel bentuk batang berwarna violet muda, kristal protein terletak subterminal berwarna gelap dengan bayangan warna violet tua, spora agak lonjong berwarna violet tua (Gambar 2 dan 3).



Gambar 3. *Bacillus thuringiensis* isolat KP3 dengan pengecatan Smirnov. Perbesaran 1000 x.

Dari semua karakteristik yang dimiliki isolat GK7 dan KP3 dapat disimpulkan bahwa kedua isolat tersebut adalah *Bacillus thuringiensis* Berliner.

Hasil uji fisiologis menunjukkan bahwa isolat GK7 dan KP3 bereaksi positif (Tabel 3.).

Tabel 3. Sifat Fisiologis Isolat GK7 dan KP3

Isolat	Sifat Fisiologis *)							
	Amilum	Glukosa	Sukrosa	Laktosa	Kasein	Katalase	Sitrat	Nitrit
GK7	+	+	+	+	+	+	+	+
KP3	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan: \*) reaksi positif

Dengan memperhatikan mortalitas yang diakibatkan oleh isolat-isolat patogenik di atas (Tabel 2) isolat KP3 dengan konsentrasi  $2,8 \times 10^8$  dapat membunuh sampai 70 % dan isolat GK7 dengan konsentrasi  $4,8 \times 10^8$  spora/ml dapat membunuh sampai 86,67 %. Ada kemungkinan bila konsentrasi inokulum dinaikkan, isolat itu akan dapat membunuh serangga uji dengan jumlah kematian, yang lebih tinggi lagi. Untuk mengetahui lebih jelas mengenai daya bunuh isolat

tersebut perlu dilakukan pengujian secara kuantitatif dengan konsentrasi yang lebih bervariasi dari yang rendah sampai pada yang lebih tinggi sehingga dapat ditentukan LC<sub>50</sub> dan LC<sub>90</sub> masing-masing isolat. Mengingat kemampuan daya bunuh isolat-isolat bakteri tersebut, maka kedua isolat ini dapat dikategorikan bahwa kedua bakteri tersebut tergolong potensial (Aizawa dan Ohba, 1986). Selain itu, terhadap semua isolat bakteri pembentuk spora yang telah diperoleh perlu diuji patogenisitas spesifiknya terhadap berbagai serangga hama lain dan vektor penyakit, sehingga host spesifik yang rentan diketahui.

## Kepustakaan

- Aizawa, K., T. Takazu, and K. Kurata, 1961. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the Dust of Silkworm Rearing House of Farmers. *J. Agric. Sci. Japan* 30 : 451-455.
- Aizawa, K. and M. Ohba, 1986. Insect Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Soils of Japan. *J. Inverteb. Pathol.* 47 : 12 - 20.
- Biro Pusat Statistik, 1988, *Survei Pertanian dan Intensitas Serangan Jasad Pengganggu Padi dan Palawija di Indonesia tahun 1987*. Biro Pusat Statistik, Jakarta.
- Burges, H.D. and N.W. Hussey, 1971, *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press Inc., London.
- Dulmage, H.T., 1981, Insecticidal Activity of Isolates of *Bacillus thuringiensis* and their Potential for Pest Control in H.D. Burges (ed.). *Microbial Control of Pests and Plant Disease 1970-1980*. pp 193 - 222. Academic Press Inc., London..
- Falcon, L.A., 1971, Use of Bacteria for Microbial Control of Insects. in H.D. Burges and N.W. Hussey (Eds.). *Microbial Control of Insects and Mites*. pp 67 - 96. Academic Press Inc. (London) LTD.
- Fast, P.G., 1981, The Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis* in H.D. Burges (Ed.). *Microbial Control of Pest and Plant Disease 1970 - 1980*. pp. 223 - 248. Academic Press Inc., London.
- Martin, P.A.W. and D.H. Dean, 1981, Genetics and Genetic Manipulation of *Bacillus thuringiensis* in H.D. Burges (Ed.). *Microbial Control of Pests and Plant Disease 1970 - 1980*. pp. 249 - 282. Academic Press Inc., London.
- Situmorang, J., S. Yuwono, A. Romas dan M.M. Ibnu Hajar, 1989, *Isolation of Bacillus Sphaericus and Related Forms Pathogenic to Culex quinquefasciatus*. The Indonesian - United States Conference : Application of Biotechnology on the Study of Animal Parasites and Their Vector. Yogyakarta. July 1, 1989.
- Smirnov, W.A., 1962. *A Staining Method for Differentiating Spore, Crystals, and Cells of Bacillus thuringiensis (Berliner)*. Forest Research Laboratory, Quebec, Canada.
- Tryon, E.H. and J.A. Litsinger, 1988. Feasibility of Using Locally Produced *Bacillus thuringiensis* to Control Tropical Insects Pests. in P.S. Teng and K.L. Heong (Eds.). *Pesticides Managements and Integrated Pest Management in Southeast Asia*. pp 73 - 81. Consortium for International Crop Protection, Maryland.